共表达构建呈现人白细胞介素-13 抗原肽的Qβ噬菌体病毒样颗粒*

白红妹 黄惟巍 刘存宝 孙文佳 杨旭 马雁冰**

（中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所 昆明 650118）

摘要：目的：构建呈现人白细胞介素-13（ interleukin-13，IL-13）抗原肽的Qβ噬菌体病毒样颗粒（virus-like particles，VLPs）疫苗。方法：将人 IL-13 抗原肽经基因重组插入Qβ噬菌体衣壳蛋白(CP)基因的C末端。在BL21细菌中，经IPTG诱导CP及C端接有IL-13 抗原肽的CP（CP /IL-13）同时表达。以硫酸铵沉淀及蔗糖密度梯度离心进行VLPs纯化及分析嵌合VLPs的存在，以HPLC分析VLPs纯度，以及以电镜观察颗粒形态。小鼠经皮下免疫VLPs后采集血清，以ELISA检测人 IL-13特异性IgG抗体水平。结果：重组蛋白CP与CP /IL-13获得成功表达，两者在密度梯度离心中有一致的、与QβVLPs相同的沉降行为，而CP /IL-13单独无Qβ颗粒行为。经纯化获得了高纯度颗粒，嵌合颗粒与Qβ颗粒形态相似。此外，该VLPs疫苗诱导小鼠产生了 IL-13特异的抗体应答。结论：利用共表达策略可成功构建呈现人 IL-13 抗原表位的嵌合VLPs，为以主动免疫方式调控IL-13在疾病中的病理作用，提供了具有临床应用潜能的疫苗形式。

关键词： 白细胞介素-13；病毒样颗粒；疫苗

Co-expression Construction of Qβ phage Virus-like Particles Presenting Human Interleukin-13 Antigenic Peptide

BAI Hong-mei HUANG Wei-wei LIU Cun-bao SUN Wen-jia YANG Xu MA Yan-bing

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract: Objective: To construct Qβ phage virus-like particles (VLPs) vaccines presenting human interleukin-13 (IL-13) antigen peptide. Methods: The human IL-13 antigen peptide was genetically recombined into the C terminus of the Qβ phage capsid protein (CP). In BL21 bacteria, the native CP and the recombinant CP with C terminal fused with IL-13 antigen peptide (CP / IL-13) were induced simultaneously by IPTG. VLPs were purified by ammonium sulfate precipitation and sucrose density gradient centrifugation, and the presence of chimeric VLPs was analyzed. The purity of VLPs was analyzed by HPLC and the morphology of the particles was observed by electron microscopy. The mice were subcutaneously immunized with VLPs and sera were collected for detection of human IL-13-specific IgG antibodies by ELISA. RESULTS: The recombinant protein CP and CP / IL-13 were successfully expressed. Both of them appeared in the same fractions of collected samples from density gradient centrifugation and had the same sedimentation behavior as the native Qβ VLPs, while CP / IL-13 alone had no Qβ particle behavior. After

*基金项目：云南省应用基础研究计划重点项目（2016FA049），国家自然科学基金面上项目（81773270）
**通讯作者：电子信箱 may@ imbcams.com.cn

purification, high purity particles were obtained. The chimeric particles were similar in shape to Qβ particles. In addition, the VLPs vaccine induced mice to develop an IL-13-specific antibody response. Conclusion: The co-expression strategy can successfully construct chimeric VLPs presenting human IL-13 epitopes, and provide a vaccine form with potentials for clinical application antagonizing the pathological effects of IL-13 in severe human diseases.
Key words: Interleukin-13; Virus-like particles; Vaccine

过敏性哮喘以炎症过程为核心，典型性地伴随有 Th2 型免疫应答[1]。Th2 细胞产生一系列细胞因子，如 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 等，在气道炎症反应中发挥重要作用，其中 IL-13 被认为是最为核心的介质[2]，其功能几乎涉及到哮喘的所有病理特征的发生、发展过程[3]。

目前，利用 IL-13 单克隆抗体进行哮喘治疗在国外已开展了临床试验研究，提示了拮抗 IL-13 具有可能的临床治疗应用前景[4]。然而，运用抗体进行治疗具有缺点，如半衰期短，在机体循环中会很快被清除；即便人源单抗也可能具有一定异源性，影响长期使用；再者，为了维持有效的免疫必须持续大量给患者输入抗体，患者须承受严重的经济负担及精神负担[5-7]。为了克服这些可能的不利因素，近年出现了一种新的疾病干预策略，即通过接种疫苗，诱导产生一定时间内存在的、针对自身细胞因子的抗体，从而达到疗效更为持久、副作用更小以及更经济的治疗效果[8-10]。

我们之前已将有效的 IL-13 抗原表位克隆到乙肝核心抗原(HBcAg) 病毒样颗粒（virus-like particles, VLPs）表面，证明可诱导高滴度中和抗体[11]。为更适应于可能的临床应用，本研究拟利用基因重组技术将证明有效的人 IL-13（氨基酸 23-41）抗原肽段呈递至 Qβ 噬菌体病毒样颗粒表面，形成一种较之 HBcAg VLPs 更具临床前景的疫苗形式。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用的动物为 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠，16-18g，6-8 周龄，购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物的开展获得中国医学科学院医学生物学研究所实验动物使用和管理委员会的许可。

1.2 质粒及菌株

共表达质粒 pRSFDuet1 购自上海百风生物科技有限公司；大肠杆菌（ E. coli） BL21 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 主要试剂

限制性内切酶 *Nco* I、*Pst* I、*Nde* I、*Kpn* I、*Bam*HⅠ、*Eco*R I， Taq 酶， T4 DNA 连接酶均购自宝生物工程（大连）有限公司；质粒小提试剂盒、 胶回收试剂盒和纯化试剂盒购自天根生化科技（北京）有限公司；重组人 IL-13 标准品购自美国 Peprotech 公司；BSA 蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司；生物素标记的兔抗鼠 IgG、亲和素标记的碱性磷酸酶、磷酸酶底物显色试剂购自美国 Sigma Aldrich 公司。

1.4 核苷酸序列的合成

在 C 末端带有 *Bam*HⅠ、*Eco*R I 酶切位点的 Qβ 噬菌体 CP 基因（CP/X）以及编码人 IL-13 抗原肽（氨基酸 23-41）的正负链核苷酸片段，以及 PCR 扩增引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成（表一）。

1.5 重组表达质粒的构建

1.5.1 抗原肽基因片段获得

将编码人 IL-13 抗原表位的寡核苷酸序列正、负链片段分别加水溶解至 50μM，各取 2μl 加水至 20μl，于 95 ℃变性 30 sec，冷却至室温，使正、负链寡核苷酸片段退火形成编码抗原肽的双链 DNA 片段。

1.5.2 质粒重组

pRSFDuet1-CP-CP/X：以合成的 CP/X 为模板，用分别带有酶切位点 *Nco* I、*Pst* I 的引物（启动子 1-CP）PCR 扩增得到原始衣壳蛋白 CP 基因，经 *Nco* I、*Pst* I 酶切后将 CP 连接至具有双表达单元的质粒载体 pRSFDuet1（图 1）中，得到表达质粒 pRSFDuet1-CP；再以 CP/X 为模板，用分别带有 *Nde* I、*Kpn* I 酶切位点的引物（启动子 2-CP/X）进行 PCR 扩增，得到 CP/X 基因，经 *Nde* I、*Kpn* I 酶切后将 CP/X 连接至 pRSFDuet1-CP 的第二个表达单元中，得到表达质粒 pRSFDuet1-CP-CP/X，该质粒在大肠杆菌中诱导表达时 CP/X 表达速率高于 CP。

pRSFDuet1-CP/X –CP：以合成的 CP/X 为模板，用分别带有酶切位点 *Nco* I、*Pst* I 的引物（启动子 1- CP/X）PCR 扩增得到 CP/X 基因，经 *Nco* I、*Pst* I 酶切后将 CP/X 连接至具有双表达单元的质粒载体 pRSFDuet1（图 1）中，得到表达质粒 pRSFDuet1-CP/X；再以 CP/X 为模板，用分别带有 *Nde* I、*Kpn* I 酶切位点的引物（启动子 2-CP）进行 PCR 扩增，得到 CP 基因，经 *Nde* I、*Kpn* I 酶切后将 CP 连接至 pRSFDuet1-CP/X 的第二个表达单元中，得到表达质粒 pRSFDuet1-CP/X –CP，该质粒在大肠杆菌中诱导表达时 CP/X 表达速率低于 CP。

pRSFDuet1-CP-CP/X 与 pRSFDuet1-CP/X –CP 分别经 *Bam*HⅠ、*Eco*R I 双酶切后与退火形成的 IL-13 抗原肽 DNA 片段连接，得到双基因表达质粒 pRSFDuet1-CP- CP/IL13 或 pRSFDuet1-CP/IL13-CP。质粒经酶切鉴定正确后送至上海铂尚生物技术有限公司测序。

1.6 目的基因的诱导表达

将重组表达质粒转化入大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞中，挑取单克隆至含有卡那霉素（50 μg/mL）的 LB 培养基中，过夜培养 12-16 小时后按 1:20 的比例转接至含卡那霉素的新鲜 LB 培养基中继续培养 2-3 小时，待菌液 OD 值达到 0.5 时，加入 IPTG（1mmol/L）诱导表达 3 小时，诱导温度 37℃。表达产物经 15% SDS-PAGE 进行分析。

1.7 重组蛋白的纯化

诱导表达后的菌液离心收集菌体，菌体用 PBS 重悬后进行超声破碎，取超声破碎上清加入硫酸铵至饱和度为 40%，室温 30 分钟，以 12000 rpm 离心 10 分钟，弃上清，沉淀用 PBS 溶解。溶解产物用 10-50%的蔗糖溶液进行密度梯度离心（38000 rpm，4 小时），从上到下每 1ml 一管取样进行 SDS-PAGE 检测。将共表达条带富集的第 8-11 层样品取出并混合，经 G-25 脱盐柱将蔗糖置换成 PBS。以透射电镜观察病毒颗粒。

1.8 小鼠免疫及血清 IL−13 抗体水平的检测

将 50μg 纯化后的嵌合颗粒分别在 0 天、14 天、28 天皮下免疫小鼠，最后一次免疫后一周采血分离血清，以 ELISA 法检测抗人 IL-13 抗体水平。具体的，将重组人 IL-13 标准蛋白

加入 96 孔板中，每孔 50 μl (2 μg/mL)，4℃湿盒包被过夜；每孔加入 200μl PBST 洗涤 3 次，加入 2% BSA 室温封闭 2 小时；PBST 洗涤 3 次，加入收获的血清（1:1000 稀释），室温反应 2 小时；PBST 洗涤 3 次，加入生物素标记的兔抗鼠 IgG（1:5000 稀释），室温孵育 1 小时；PBST 洗涤 3 次，加入亲和素标记的碱性磷酸酶（1:10000），室温孵育 1 小时；PBST 洗涤 5 次，加入碱性磷酸酶底物，经酶标仪检测抗体水平。

2 结果

2. 1 质粒构建

质粒图谱如图 1 所示，构建的质粒经酶切与琼脂糖电泳分析鉴定，结果与预期相符，表明获得了表达 CP 以及共表达 CP 与 CP/IL13 重组质粒。

2. 2 目的蛋白的表达及纯化

Qβ噬菌体衣壳蛋白（CP）的分子量大小约为 14.1KDa，其 C 末端接有 IL13 抗原肽（CP/IL13）的分子量大小约为 16.2 KDa。经 IPTG 诱导后，菌体较之诱导前有特异表达产物出现，且大小与预期相符。如图 2（a）所示，当 CP 连接至启动子 1（promoter-1）之后，CP/IL13 连接至启动子 2（promoter-2）之后时，CP/IL13 的表达量高于 CP，表达产物大部分形成包涵体，只有少部分可溶。经蔗糖密度梯度离心后，CP/IL13 主要在 1-4 管，而 CP 主要在 7-11 管，并未得到有效的嵌合颗粒，如图 2b 所示。交换 CP 及 CP/IL13 在质粒表达单元中的位置，使 CP 的表达量高于 CP/IL13（图 2c），大部分产物以可溶形式存在。共表达产物经密度梯度离心后 CP/IL13 的富集行为与 CP 一致，主要分布在第 8-11 管（图 2d），与单独表达的 CP 颗粒行为一致（图 2e）。结果表明，经恰当比例的共表达，CP 与 CP/IL13 形成了嵌合病毒样颗粒。

2. 3 病毒样颗粒的鉴定

尽管密度梯度离心一定程度上提示了 VLPs 的存在，我们进一步以 HPLC 凝胶过滤层析分析颗粒的存在及纯度。结果显示，CP 和 CP/IL13 共表达蛋白出峰位置（图 3a）与原始的 CP 颗粒一致（图 3b），表明共表达蛋白形成了嵌合 VLPs，且纯化的蛋白主要以颗粒形式存在。此外，经电镜观察，纯化后的共表达蛋白可见直径约 25 nm 的 VLPs（图 3c），与原始 CP 形成的 VLPs 形态相似。

2. 4 免疫小鼠血清中 IL−13 抗体水平

免疫小鼠获得的血清经 ELISA 检测结果显示，经 CP、CP/IL13 嵌合颗粒免疫后，小鼠产生了特异性的人 IL-13 抗体应答（图 4），表明插入的人 IL-13 抗原表位被有效呈递于嵌合 VLPs 表面，且嵌合 VLPs 具备有效突破 B 细胞免疫耐受，诱

导产生针对自身 IL-13 分子的特异抗体的能力。经抗体的滴度检测分析，本实验小鼠中，诱导的特异抗体滴度最高可达 1:10000 。

3 讨论

自引进抗微生物疫苗以来，很多传染性疾病得到了有效控制。然而，非传染性的人类慢性疾病，如过敏性疾病、自身免疫性疾病及肿瘤等显着增加，成为人类健康的重大威胁。基于单克隆抗体及可溶性受体在临床上的成功应用，靶向疾病中关键病理分子的疫苗，对于治疗严重的、通常是终生的慢性疾病，表现出诱人的前景。先前的研究证明，如果单个分子对疾病的发病机理或维持是足够关键的话，则靶向此分子的免疫干预是可能临床有效的。如抗 IgE 疗法用于治疗中度至重度哮喘[12, 13]，用单克隆抗体或可溶性受体的抗 TNF-α 疗法用于治疗类风湿性关节炎[14, 15]、炎症性肠病[16, 17]等。

IL-13 是哮喘的关键介质，马雁冰等人以 HBcAg VLPs 为载体设计了一种基于鼠 IL-13 的肽疫苗[18]，该疫苗能够有效地打破免疫耐受，并产生持续存在的、高滴度的内源性 IL-13 自身抗体。在急性及慢性过敏性气道炎症小鼠模型中，该疫苗的免疫显着抑制过敏反应，包括气道炎症、粘液分泌过多以及对吸入乙酰甲胆碱的气道高反应性等。随后，我们在分析预测的基础上，以鼠 IL-13 疫苗研究为基础，构建了呈现人 IL-13 相应抗原表位的 HBcAg 病毒样颗粒疫苗[11]，为进一步在猴体哮喘模型和人类临床试验中开展 IL-13 疫苗主动免疫干预哮喘疾病进程的研究奠定了基础。虽然使用 HBcAg 作为载体的安全性已经在疟疾疫苗的 I 期临床试验中得到证实[19]，但我国乙肝普遍流行，该疫苗免疫后产生的乙肝核心抗体可能干扰临床上对乙肝感染的检测。因此，本实验通过共表达构建嵌合 VLPs 的策略，成功以 Qβ 噬菌体病毒样颗粒为载体，将证明有效的人 IL-13（氨基酸 23-41）抗原肽段呈递至颗粒表面，降低了载体本身对临床检测的干扰作用。迄今为止，国际上已开展了 10 余项以 Qβ VLPs 作为疫苗载体，靶向疾病关键病理分子进行疾病治疗干预的人类临床试验研究[20-23]，提示这一载体较好的临床应用前景。

Qβ 噬菌体 CP 蛋白在大肠杆菌 BL21（DE3）中单独表达是可溶的，并能装配成病毒样颗粒[24]。而 C 末端插入人 IL13 抗原肽后，可溶性降低，大部分表达产物形成包涵体，无法有效形成 VLPs。在共表达体系中 CP 蛋白的病毒样颗粒装配

能力也可能受其影响，我们发现，当自折叠、装配能力差的 CP/IL13 表达量高于 CP 时，共表达产物难以有效组装成嵌合颗粒。因此，我们做了调整，让 CP/IL13 表达量低于 VLPs 装配能力强的 CP，此时在 CP 的主导下，共表达产物可以有效组装成嵌合颗粒。尽管嵌合颗粒表面的抗原浓度有所降低，但我们的研究显示，该重组嵌合颗粒免疫小鼠后，仍能有效刺激小鼠体内产生高水平的人 IL-13 抗体。

综上所述，本研究以重组嵌合颗粒策略，实现了 Qβ 噬菌体病毒样颗粒作为载体呈现人 IL13 抗原肽，形成了一种安全、有效的的抗细胞因子新型疫苗形式，为人类临床试验中开展 针对 IL-13 等病理分子的疫苗主动免疫疾病干预治疗研究提供了基础。

表一 人 IL-13 抗原肽正负链核苷酸序列以及 PCR 扩增引物

Table 1 Human IL-13 antigen peptide nucleotide sequences and PCR amplification primers

名称	寡核苷酸序列（ 5′ →3′ ）
IL13 抗原肽	正链 GATCCGTTCCGCCGTCTACCGCTCTGCGTGAACTGATCGAAGAACTGGTTAACATCACCCAGG
	负链 AATTCCTGGGTGATGTTAACCAGTTCTTCGATCAGTTCACGCAGAGCGGTAGACGGCGGAACG
启动子 1-CP	正链 CATGCCATGGCAAAATTAGAGACTGTTA
	负链 ATCCCTGCAGTTAATACGCTGGGTTCAGCTGA
启动子 2- CP/X	正链 GAGCATATGGCAAAATTAGAGA
	负链 AAGGGTACCTTAGAATTCGCCACCGGA
启动子 1- CP/X	正链 CATGCCATGGCAAAATTAGAGACTGTTA
	负链 AAGCTGCAGTTAGAATTCGCCACCGGA
启动子 2- CP	正链 GAGCATATGGCAAAATTAGAGA
	负链 AAGGGTACCTTAATACGCTGGGTTCAGCTGA

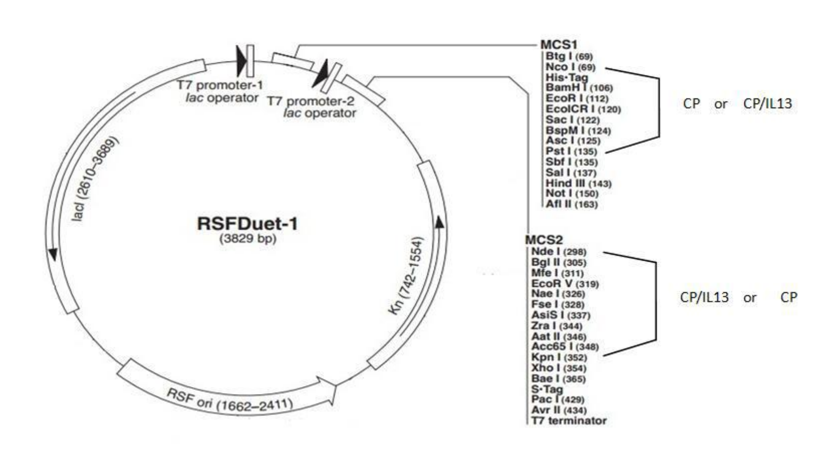


图 1 pRSFDuet1 质粒图谱

Figure 1 pRSFDuet1 Plasmid map

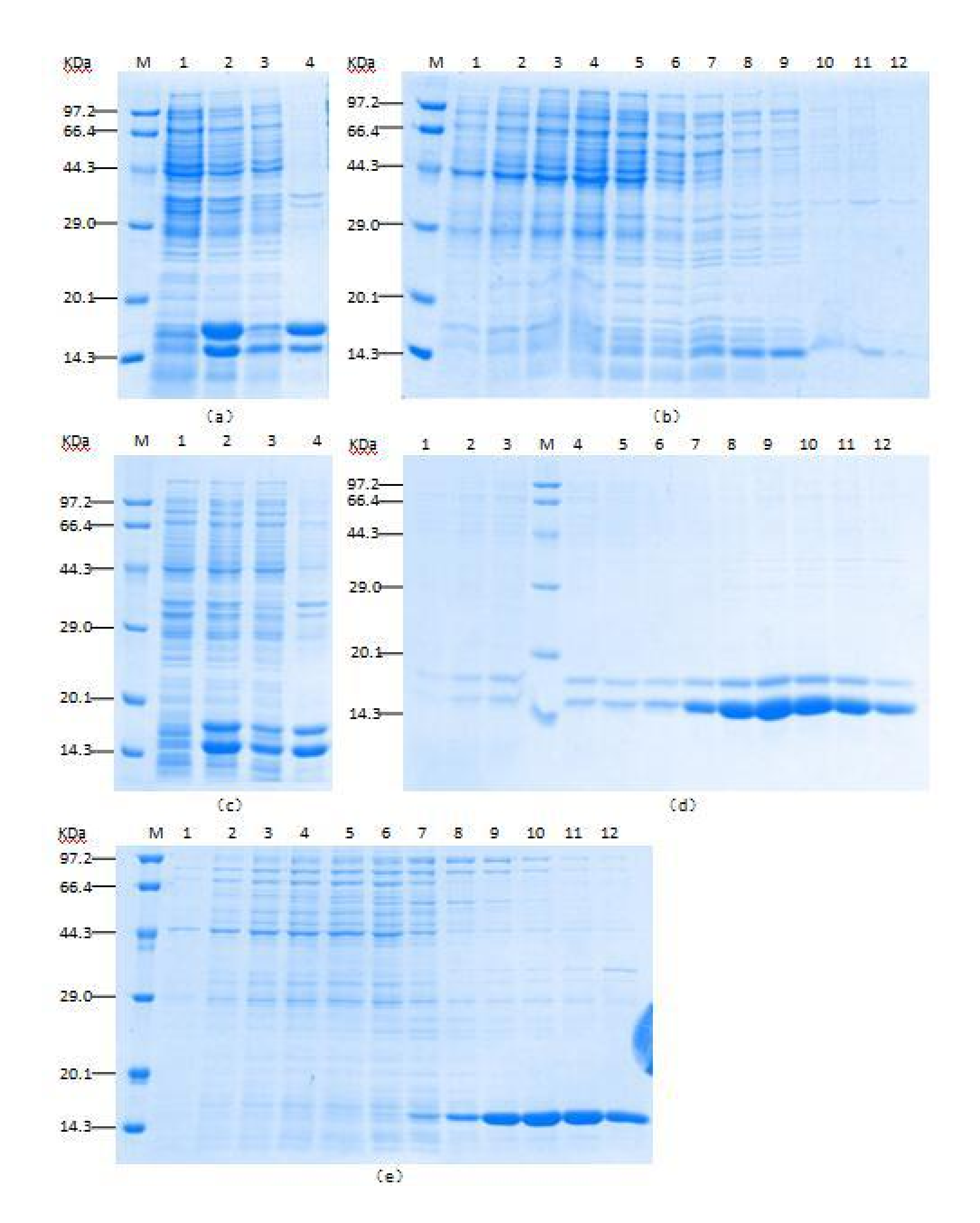


图 2 重组蛋白的表达及密度梯度离心

Figure 2 The expression and density gradient centrifugation analysis of the recombinant proteins

(a)and (c)The co-expression of CP and CP / IL13 M: Protein marker; 1: pRSFDuet1-CP- CP/IL13 or pRSFDuet1- CP/IL13-CP without the induction of IPTG; 2: pRSFDuet1-CP- CP/IL13 or pRSFDuet1- CP/IL13-CP induced by IPTG for 3h; 3: The supernatant of induced bacterial cells; 4: The precipitate of induced bacterial cells; a: pRSFDuet1-CP- CP/IL13 ; c: pRSFDuet1-CP/IL13-CP (b) and (d) Sucrose density gradient centrifugation analysis of recombinant CP- CP/IL13 or CP/IL13-CP. M: Protein marker; 1-12: The sample fractions from the sucrose density gradient centrifugation collected from top to bottom; b: pRSFDuet1-CP- CP/IL13 ; c: pRSFDuet1-CP/IL13-CP (e) Sucrose density gradient centrifugation analysis of CP M: Protein marker; 1-12: The sample fractions from the sucrose density gradient centrifugation collected from top to bottom.

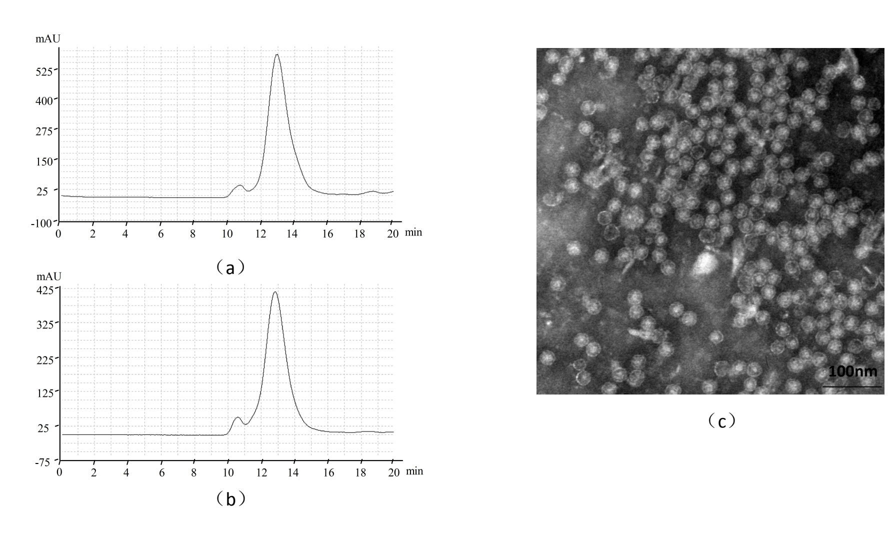


图 3　重组蛋白的 HPLC 凝胶过滤层析分析及电镜观察

Figure 3　HPLC analysis of recombinant protein and electronic microscopy of VLPs

(a) HPLC profile of recombinant CP/IL13-CP (b) HPLC profile of recombinant CP (c) Electronic microscopy of CP/IL13- CPVLPs

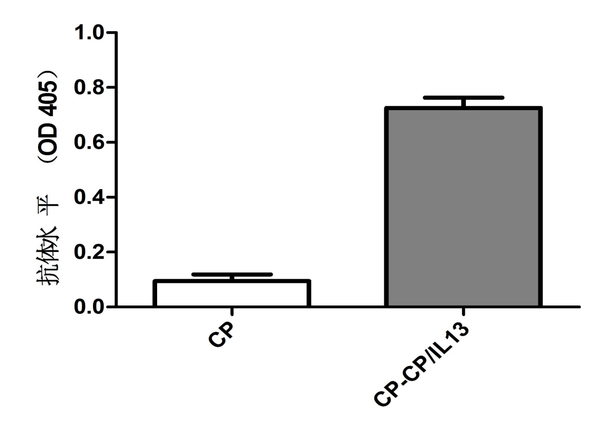


图 4 ELISA 检测小鼠血清中 IL-13 抗体水平

Figure 4　Determination of IL-13 antibody levels in sera of the immunized mice by ELISA

参考文献

1. Doran E，Cai F，Holweg CTJ，et al. Interleukin-13 in Asthma and Other Eosinophilic Disorders. Frontiers in medicine，2017，4:139.
2. Devos FC，Pollaris L，Cremer J，et al. IL-13 is a central mediator of chemical-induced airway hyperreactivity in mice. PloS one，2017，12(7):e0180690.
3. Parulekar AD，Kao CC，Diamant Z，et al. Targeting the interleukin-4 and interleukin-13 pathways in severe asthma: current knowledge and future needs. Current opinion in pulmonary medicine，2018，24(1):50-55.
4. Hambly N，Nair P. Monoclonal antibodies for the treatment of refractory asthma. Current opinion in pulmonary medicine，2014，20(1):87-94.
5. Holgate ST，Chuchalin AG，Hebert J，et al. Efficacy and safety of a recombinant anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab) in severe allergic asthma. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology，2004，34(4):632-638.
6. Tyring S，Gottlieb A，Papp K，et al. Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. Lancet，2006，367(9504):29-35.
7. Borish LC，Nelson HS，Corren J，et al. Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. The Journal of allergy and clinical immunology，2001，107(6):963-970.
8. Chu X，Li Y，Long Q，et al. Chimeric HBcAg virus-like particles presenting a HPV 16 E7 epitope significantly suppressed tumor progression through preventive or therapeutic immunization in a TC-1-grafted mouse model. International journal of nanomedicine，2016，11:2417-2429.
9. 孙文佳，姚宇峰，杨旭，et al.乙肝核心抗原病毒样颗粒呈现 HPV16L1 抗原表位及特异抗体诱导. 中国生物工程杂志，2017，37(3) : 58-64.
10. Long Q，Huang W，Yao Y，et al. Virus-like particles presenting interleukin-33 molecules: immunization characteristics and potentials of blockingIL-33/ST2 pathway in allergic airway inflammation. Human vaccines & immunotherapeutics，2014，10(8):2303-2311.
11. 唐增华，龙琼，姚宇峰，et al.呈现人白细胞介素_13 抗原表位的病毒样颗粒疫苗的构建. 中国生物制品学杂志，2013，26（11）：1533-1539.
12. Jat KR，Walia DK，Khairwa A. Anti-IgE therapy for allergic bronchopulmonary aspergillosis in people with cystic fibrosis. The Cochrane database of systematic reviews，2015，(11):CD010288.
13. Holgate S，Casale T，Wenzel S，et al. The anti-inflammatory effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation. The Journal of allergy and clinical immunology，2005，115(3):459-465.
14. Scott DL，Kingsley GH. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. The New England journal of medicine，2006，355(7):704-712.
15. Scott DL，Ibrahim F，Farewell V，et al. Tumour necrosis factor inhibitors versus combination intensive therapy with conventional disease modifying anti-rheumatic drugs in established rheumatoid arthritis: TACIT non-inferiority randomised controlled trial. Bmj，2015，350:h1046.
16. Iwanczak BM，Kierkus J，Ryzko J，et al. Induction and maintenance infliximab therapy in children with moderate to severe ulcerative colitis: Retrospective, multicenter study. Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University，2017，26(1):57-61.

17. Sandborn WJ. New concepts in anti-tumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease. Reviews in gastroenterological disorders， 2005，5(1):10-18.
18. Ma Y，HayGlass KT，Becker AB，et al. Novel recombinant interleukin-13 peptide-based vaccine reduces airway allergic inflammatory responses in mice. American journal of respiratory and critical care medicine， 2007，176(5):439-445.
19. Nardin EH，Oliveira GA，Calvo-Calle JM，et al. Phase I testing of a malaria vaccine composed of hepatitis B virus core particles expressing Plasmodium falciparum circumsporozoite epitopes. Infection and immunity， 2004，72(11):6519-6527.
20. Cornuz J，Zwahlen S，Jungi WF，et al. A vaccine against nicotine for smoking cessation: a randomized controlled trial. PloS one， 2008，3(6):e2547.
21. Doucet M，El-Turabi A，Zabel F，et al. Preclinical development of a vaccine against oligomeric alpha-synuclein based on virus-like particles. PloS one， 2017，12(8):e0181844.
22. Low JG，Lee LS，Ooi EE，et al. Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine: results from a double-blinded, randomized Phase I clinical trial in healthy Asian volunteers. Vaccine， 2014，32(39):5041-5048.
23. Spohn G，Schori C，Keller I，et al. Preclinical efficacy and safety of an anti-IL-1beta vaccine for the treatment of type 2 diabetes. Molecular therapy Methods & clinical development， 2014，1:14048.
24. Brown SD，Fiedler JD，Finn MG. Assembly of hybrid bacteriophage Qbeta virus-like particles. Biochemistry， 2009，48(47):11155-11157.